

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659124

研究課題名（和文） タンパク質マイクロアレイ法を用いたアスベスト関連腫瘍マーカー開発戦略の確立

研究課題名（英文） Development of asbestos related tumor marker using protein array methods

研究代表者

菅沼 成文 (SUGANUMA NARUFUMI)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：50313747

研究成果の概要（和文）：タンパク質アレイによるバイオマーカー測定系の確立のため、簡易の手動式アレイヤーでのタンパク質固定における問題点を解決し、ヒト血漿サンプルをアレイに固定後、HRP 標識した抗メソセリン抗体と反応させ発光で検出する測定系を構築した。バイオマーカーに関しては、現在実施しているメソセリンの有用性の検討とともに、これに限定せず、共同研究者と連携しながら、候補となるタンパクについて網羅的な検討を進めていく。

研究成果の概要（英文）：Protein array method was applied to develop biomarker measurement system. Manual arrayer was used to spot human plasma sample and HRP labeled anti-mesothelin antibody was applied. The system detects the protein at C terminal, while the available ELISA uses two antibodies for N and C terminals. The results from the two methods did not correlate each other. Further analysis using other clinical data including radiological findings is now underway. Optimization of protein array measurement to reduce processing time is also needed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	300,000	3,000,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：産業衛生、プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

現在、悪性中皮腫は画像診断での発見時には殆どの例で治療不能であるため、介入可能な前臨床期で発見できるバイオマーカーの開発が喫緊の課題である。

申請者らは蛍光二次元電気泳動法を中心とした最先端のプロテオーム解析技術を用

いてバイオマーカーを開発し、研究成果を実用化に導いてきた実績を有している。しかし、電気泳動を中心とした開発戦略では凍結病理標本からの探索が主で非侵襲的検体からの開発は困難であるし、現在の一般的なプロテオーム解析技術の感度ではタンパク量の多い方から 3000 種程度の検出しかできず、

検討すべきタンパクを選別ができていない可能性がある。一方、検査法の実用に際しては精度を評価する少数の症例対照研究による感度・特異度の検討のみならず、実際の検診あるいは臨床現場を想定した有病率と陽性反応的中度（検査陽性者中の的中率）を指標にした有効性の検討が必要だが、後者は十分に検討されていない。

これらの課題克服のために、我々は血漿・血清など雑多なタンパクを含む試料を固層化したタンパク質マイクロアレイ法による網羅的腫瘍マーカー検索システムを実現により、1) 抗原・抗体の条件設定のルーチン化、2) 既知の重要ながん関連タンパクに対する市販抗体を用いた網羅的検索によるバイオマーカー候補選択、3) 既に蓄積された症例対照研究及びリスク集団コホート研究の臨床検体の省スペース保管とマーカーの精度及び有効性検討のための曝露者集団検体バンクとしての整理、4) 大量の検体をアレイヤーでスライドガラス上にプロットすることにより、臨床検体を極微量で安定的に検査するハイ・スループットの大量検体スクリーニング法をシステムとして実現しバイオマーカー開発の戦略転換を提案する。

マイクロアレイ法は網羅的な解析に不可欠なハイ・スループットな検査法である。合成した DNA、抗体などを固定相に用いる DNA マイクロアレイ、抗体マイクロアレイは既に市販化されている。一方、臨床情報が不可欠な試料（血漿・血清などの生体試料）を固層化したマイクロアレイは実用化されていない。これは生体組織バンクの整備や臨床と基礎のトランスレーショナルリサーチが円滑に行われていないからであり、バイオマーカー開発戦略の盲点である。

二次元電気泳動法や質量分析などのプロテオミクス技術を応用した腫瘍マーカー研究は大きな期待がされている。網羅的解析を通じてこの10年間で発見されたバイオマーカーのほとんどは、既知のタンパク質パスウェイに含まれるものである。すなわち、最先端のプロテオーム解析技術を用いた研究の成果は、既存のタンパク質の診断上の新しい適応を提示している。一方、既存のプロテオーム解析技術では転写因子などの重要かつ微量なタンパク質は網羅的に観察できないことも分かっている。そこで戦略を転換し、既のがんの発生や進展に関わることが分かっているタンパク質に対する抗体を利用し、臨床病理情報が付加された検体を用いてスクリーニングし目的とする臨床状態を適切に指摘できる抗体を選び出すことにより、バイオマーカー候補を選び出すこととする。

今回用いる600種類のがん関連タンパク質は二次元電気泳動法や質量分析では網羅的に観察できないことが判明しているものば

かりである。対象とするタンパク質は、細胞接着、転写、DNA複製、アポトーシス、シグナル伝達、など10種類以上のがん研究において重要なパスウェイをカバーしている。

腫瘍マーカーの開発には、検査法自体の精度を示す少数の症例対照研究による感度・特異度が検討のみではなく、実際の検診あるいは臨床現場を想定した有病率と陽性反応的中度（検査陽性者中の的中率）を指標にした有効性の検討がなければ実用できない。腫瘍マーカー開発研究に必要な基盤として、腫瘍マーカー検索の対象となる臨床検体や検診検体の有効利用のための技術としてタンパク質マイクロアレイ法を応用した効率的な腫瘍マーカー検索システムを確立することで実際の場面での有効性を簡便に検討できるようにする。

2. 研究の目的

質量分析装置、二次元電気泳動等のプロテオミクス技術に替わる新たな腫瘍マーカー開発の基礎技術としてハイ・スループット検査法であるマイクロアレイ法を生体試料のアレイ化による新たな腫瘍マーカー開発戦略を提案する。本研究の最初のターゲットはアスベスト曝露集団に発生する悪性中皮腫と肺癌である。精度評価用の百人単位の症例対照群及び有効性評価用の数万人単位のリスク集団の検体バンクを作成し、既知の中皮腫・肺癌それぞれの既知の腫瘍マーカーに対するモノクローナル抗体や、600のがん関連タンパク質を含む1500超の抗体を用いて網羅的なスクリーニングを行い、効果的な腫瘍マーカー開発戦略を確立する。

3. 研究の方法

初年度に既知の中皮腫・肺癌それぞれの腫瘍マーカーや非特異的炎症マーカーとそのモノクローナル抗体を用いて抗原・抗体双方を希釈系列にしてアレイヤーを用いてスライドガラス上にスポットすることで、抗原抗体反応の至適濃度を決定し、タンパク質アレイによる抗原抗体反応検出法を確立する。また、精度検討用検体バンク及び有効性検診用検体バンクの血漿・血清をスライドガラスに約1000-5000検体をプロットしこれを600枚程度になるように作成する。この2つの検体バンクを用いて、既知のマーカーについてマイクロアレイで決定した至適濃度で測定し従来法による結果と比較する。2年目は、分担者の近藤が保有する約1500種の抗体から、今回は特に600種類の抗体を候補として、同様に至適濃度を決定し、網羅的に600種について2つの検体バンクで反応をみることで、バイオマーカー候補を選択する。これらのデータを元に、多重ロジスティック回帰分析を用いて、尤度比を最大にするマーカーの

組み合わせを選び出す。

4. 研究成果

タンパク質アレイによるバイオマーカー測定系の確立のため、簡易の手動式アレイヤーでのタンパク質固定における問題点を解決し、ヒト血漿サンプルをアレイに固定後、HRP 標識した抗メソセリン抗体（認識部位 C 末端側）と反応させ発光で検出する測定系を構築した。血漿は 8 倍希釈、HRP 標識抗体は 100 倍希釈、反応時間は 4℃一晩、その後は市販の HRP 検出キットを使用して、37℃1 時間で検出した。この実験系では、入手可能な ELISA キットが N 末端 C 末端の 2 抗体を用いているのに対して、C 末端側 1 種類のみ抗体を使用しているため、測定値の相関解析を行う必要があった。そこで、臨床サンプル 80 個を使って、ELISA 法との比較を行ったところ、相関係数が 0.0193 と相関が見られず、市販キットとは、別の測定法であることが判明した。

初年度に 2 マイクロリットルの 4 倍希釈したヒト血漿（抗原）のニトロセルロースフィルターへのスポットおよび固定と、HRP 標識した mesothelin 抗体との反応による、プロテインアレイの原理確認をおこない、成功した。次の段階として、スポットによる極微量（0.5 マイクロリットル以下）の希釈した血漿のガラスプレートへのスポットと、HRP 標識した mesothelin 抗体との反応による、プロテインアレイの測定原理の確認を行い、シグナルの検出に成功した。昨年度は、N-ERC mesothelin sandwich EIA 法によって濃度を規定されたヒト血漿 3 検体（低、中、高濃度）を用いて、一昨年度開発に成功したマイクロアレイの同時再現性、測定間再現性、希釈試験および N-ERC mesothelin sandwich EIA 法との相関を調べた。その結果、4 回測定した際の同時再現性は、6.4~14.0%、希釈直線性は $r^2=0.989$ と良好な結果が得られた。N-ERC mesothelin sandwich EIA 法との相関については、 $r^2=0.0193$ とほとんど相関が認められなかった。この原因として、N-ERC/mesothelin kit では、2 種類の抗体でのサンドイッチにより、分泌型 mesothelin のアミノ基側ペプチドを測定しているのに対し、我々の方法は、使用している抗体が 1 種類であるため、様々な分解型の分泌型 mesothelin が検出されているため、kit よりも高い濃度として検出される可能性が考えられた。

本法による mesothelin 測定結果とメソテリオーマの相関については、次回の検討課題として残された。

今後、さらに臨床サンプルを追加して、あらかじめ取得した胸部レントゲン読影の診断結果と本系測定結果との相関を解析し、中

皮腫のバイオマーカーになりうるか、比較検討をおこなう。現在、1.5 日要している測定時間を半日程度で測定可能となるよう、反応時間の最適化をはかっていく。バイオマーカーに関しては、現在実施しているメソセリンの有用性の検討とともに、これに限定せず、共同研究者と連携しながら、候補となるタンパクについて網羅的な検討を進めていく。また、タンパク質アレイと既存の測定方法の利点を生かしたバイオマーカー探索の効率化につなげることのできる戦略を確立する。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 26 件）

- ① Uhlén, M., Oksvold, P., Älgenäs, C., Hamsten, C., Kondo, T., *et al.*, Antibody-based protein profiling of the human chromosome 21. *Mol Cell Proteomics* 2012, *11*, M111.013458. (査読有)
- ② Morofuji, N., Ojima, H., Onaya, H., Okusaka, T., Kondo, T., *et al.*, Macrophage-capping protein as a tissue biomarker for prediction of response to gemcitabine treatment and prognosis in cholangiocarcinoma. *J Proteomics* 2012, *75*, 1577-1589. (査読有)
- ③ Kikuta, K., Kubota, D., Saito, T., Orita, H., Kondo, T., *et al.*, Clinical proteomics identified ATP-dependent RNA helicase DDX39 as a novel biomarker to predict poor prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumor. *J Proteomics* 2012, *75*, 1089-1098. (査読有)
- ④ Hosako, M., Muto, T., Nakamura, Y., Tsuta, K., Kondo, T., *et al.*, Proteomic study of malignant pleural mesothelioma by laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis identified cathepsin D as a novel candidate for a differential diagnosis biomarker. *J Proteomics* 2012, *75*, 833-844. (査読有)
- ⑤ Fujii, K., Suzuki, N., Ikeda, K., Hamada, T., Kondo, T., *et al.*, Proteomic study identified HSP 70 kDa protein 1A as a possible therapeutic target, in combination with histone deacetylase inhibitors, for lymphoid neoplasms. *J Proteomics* 2012, *75*, 1401-1410. (査読有)

- ⑥ Kitajima K, Suzuki K, Senda M, Kita M, Nakamoto Y, Sakamoto S, Onishi Y, Maeda T, Yoshikawa T, Ohno Y, Suganuma N, Sugimura K. Preoperative nodal staging of uterine cancer: is contrast-enhanced PET/CT more accurate than non-enhanced PET/CT or enhanced CT alone? *Ann Nucl Med* 2011;25: 5110. (査読有)
- ⑦ Ngatu NR, Phillips EK, Wembonyama SO, Hirota R, Kaunge NJ, Mbutshu LH, Perry J, Yoshikawa T, Jagger J, Suganuma N. Practice of universal precautions and risk of occupational blood-borne viral infection among Congolese health care workers. *American Journal of Infection Control*. doi:10.1016/j.ajic.2011.01.021(査読有)
- ⑧ Hirota R, Ngatu NR, Miyamura M, Nakamura H, Suganuma N. Goishi Tea Consumption Inhibits Airway Hyperresponsiveness in BALB/c Mice. *BMC Immunology* 2011, 12:45doi:10.1186/1471-2172-12-45 (査読有)
- ⑨ Hirai T, Kusaka Y, Suganuma N, Seo A, Tobita Y. Work form affects maximum oxygen uptake for one year in workers. *Ind Health* 2011;49: 3210. (査読有)
- ⑩ Suehara, Y., Tochigi, N., Kubota, D., Kikuta, K., Kondo, T., et al., Secernin-1 as a novel prognostic biomarker candidate of synovial sarcoma revealed by proteomics. *J Proteomics* 2011, 74, 829-842. (査読有)
- ⑪ Muto, T., Taniguchi, H., Kushima, R., Tsuda, H., Kondo, T., et al., Global expression study in colorectal cancer on proteins with alkaline isoelectric point by two-dimensional difference gel electrophoresis. *J Proteomics* 2011, 74, 858-873. (査読有)
- ⑫ Misek, D. E., Kondo, T., Duncan, M. W., Proteomics-based disease biomarkers. *Int J Proteomics* 2011, 2011, 894618. (査読有)
- ⑬ Mima, T., Tsuta, K., Takahashi, F., Yoshida, A., Kondo, T., et al., Steroid receptor expression in thymomas and thymic carcinomas. *Cancer* 2011, 117, 4396-4405. (査読有)
- ⑭ Kubota, D., Orita, H., Yoshida, A., Gotoh, M., Kondo, T., et al., Pftin as a prognostic biomarker for gastrointestinal stromal tumor: validation study in multiple clinical facilities. *Jpn J Clin Oncol* 2011, 41, 1194-1202. (査読有)
- ⑮ Kato, H., Nishimura, T., Ikeda, N., Yamada, T., Kondo, T., et al., Developments for a growing Japanese patient population: facilitating new technologies for future health care. *J Proteomics* 2011, 74, 759-764. (査読有)
- ⑯ Hagiwara, T., Saito, Y., Nakamura, Y., Tomonaga, T., Kondo, T., et al., Combined use of a solid-phase hexapeptide ligand library with liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis for intact plasma proteomics. *Int J Proteomics* 2011, 2011, 739615. (査読有)
- ⑰ Gotoh, M., Arai, E., Wakai-Ushijima, S., Hiraoka, N., Kondo, T., et al., Diagnosis and prognostication of ductal adenocarcinomas of the pancreas based on genome-wide DNA methylation profiling by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification. *J Biomed Biotechnol* 2011, 2011, 780836. (査読有)
- ⑱ Arai, E., Wakai-Ushijima, S., Fujimoto, H., Hosoda, F., Kondo, T., et al., Genome-wide DNA methylation profiles in renal tumors of various histological subtypes and non-tumorous renal tissues. *Pathobiology* 2011, 78, 1-9. (査読有)
- ⑲ Hirota R, Roger NN, Nakamura H, Song HS, Sawamura M, Suganuma N. Anti-inflammatory effects of limonene from yuzu (Citrus junos Tanaka) essential oil on eosinophils. *J Food Sci* 2010; 75(3):H87-92. (査読有)
- ⑳ Ngatu NR, Suzuki S, Kusaka Y, Shida H, Akira M, Suganuma N. Effect of a two-hour training on physicians' skill in interpreting Pneumoconiotic chest radiographs. *J Occup Health* 2010; 52(5): 294-301. (査読有)
- (21) Akai Y, Adachi N, Hayashi Y, Eitoku M, Sano N, Natsume R, Kudo N, Tanokura M, Senda T, Horikoshi M. Structure of the histone chaperone CIA/ASF1-double bromodomain complex linking histone modifications and site-specific histone eviction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(18):8153-8. (査読有)
- (22) Ngatu NR, Hirota R, Eitoku M, Muzembo

- BA, Nishimori M, Kuramochi M, Shintani S, Inoue S, Takiuchi R, Maegawa M, Ribble D, Mbenza MA, Situakibanza NTH, Mbanzulu PD, Suganuma N. Perception of the risk of sexual transmission of HIV among Congolese and Japanese university students. *Environmental Health and Preventive Medicine*. DOI: 10.1007/s12199-011-0232-z. (査読有)
- (23) Shibata, T., Kokubu, A., Miyamoto, M., Hosoda, F., Kondo, T., *et al.*, DEK oncoprotein regulates transcriptional modifiers and sustains tumor initiation activity in high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung. *Oncogene* 2010, 29, 4671-4681. (査読有)
- (24) Ojima, H., Yoshikawa, D., Ino, Y., Shimizu, H., Kondo, T., *et al.*, Establishment of six new human biliary tract carcinoma cell lines and identification of MAGEH1 as a candidate biomarker for predicting the efficacy of gemcitabine treatment. *Cancer Sci* 2010, 101, 882-888. (査読有)
- (25) Kikuta, K., Tochigi, N., Saito, S., Shimoda, T., Kondo, T., *et al.*, Peroxiredoxin 2 as a chemotherapy responsiveness biomarker candidate in osteosarcoma revealed by proteomics. *Proteomics Clin Appl* 2010, 4, 560-567. (査読有)
- (26) Akishima-Fukasawa, Y., Ino, Y., Nakanishi, Y., Miura, A., Kondo, T., *et al.*, Significance of PGP9.5 expression in cancer-associated fibroblasts for prognosis of colorectal carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2010, 134, 71-79. (査読有)
- [学会発表] (計 17 件)
- ① 近藤格 Proteomics application for sarcoma : The symposium of therapy and diagnosis of bone and soft tissue neoplasm in upper extremity. 手外科研究所、上海、中国、2012
- ② 近藤格 プロテオーム解析による個別化医療のためのバイオマーカー解析、日本臨床検査学会、岡山、2012
- ③ 近藤格 A linkage application of multi-dimensional chromatography, solid-phase peptide ligand library, two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry towards plasma biomarker development. HPLC研究会、ブタペスト・ハンガリー、2011
- ④ プロテオーム解析によるがんバイオマーカー解析 (シンポジウム)、日本プロテオーム学会、新潟、2011
- ⑤ 近藤格 SOLID-PHASE HEXAPEPTIDE LIGAND LIBRARY WITH LIQUID CHROMATOGRAPHY AND TWO-DIMENSIONAL DIFFERENCE GEL ELECTROPHORESIS FOR INTACT PLASMA PROTEOMICS. ヒトプロテオーム機構年会、ジュネーブ、スイス、2011
- ⑥ 近藤格 Cancer Proteomics for Biomarker Development toward Personalized Medicine. 東・中央ヨーロッパプロテオーム学会、プラハ、チェコ、2011
- ⑦ 近藤格 Proteomic Study of Malignant Pleural Mesothelioma by Laser Microdissection and Two-dimensional Difference Gel Electrophoresis: Cathepsin D as a Novel Candidate for a Differential Diagnosis Biomarker. 結合組織腫瘍学会、シカゴ、米国、2011
- ⑧ 近藤格 Cancer Proteomics for Biomarker Development toward Personalized Medicine. 日本癌学会学術総会、名古屋、2011
- ⑨ 近藤格 「Cancer Proteomics for Biomarker Development toward Personalized Medicine」日米癌学会合同会議、千葉、2011
- ⑩ Suganuma N, Tamura A, Funakoshi M, *et al.* Asbestos exposure among Primary Lung Cancer Patients in eastern Japan. American Thoracic Society 2010, 14-19 May, New Orleans.
- ⑪ 近藤格 「Cancer Proteomics for Biomarker Development」日本プロテオーム学会シンポジウム、千葉、2010
- ⑫ 近藤格 「蛍光二次元電気泳動法と抗体を用いたプロテオーム解析による大腸がんバイオマーカーの開発」大腸癌研究会、鹿児島、2010
- ⑬ 近藤格 「電気泳動法を用いたがん個別化医療のためのバイオマーカー開発」日本電気泳動学会、札幌、2010
- ⑭ 近藤格 「Cancer Proteomics for Biomarker Development toward Personalized Medicine」日本癌学会学術集会シンポジウム、大阪、2010
- ⑮ 近藤格 「Cancer Proteomics for Biomarker Development」ヨーロッパプロテオーム学会、エストリル、ポルトガル、2010
- ⑯ 近藤格 「Biomarker Development by Sarcoma Proteomics」結合組織腫瘍学会、パリ、フランス、2010

- ⑰ 近藤 格 「Cancer Proteomics for Biomarker Development toward Personalized Medicine」日本分子生物学学会ワークショップ、神戸、2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅沼 成文 (SUGANUMA NARUFUMI)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：50313747

(2) 研究分担者

樋野 興夫 (HINO OKIO)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：90127910
近藤 格 (KONDO TADASHI)
国立がんセンター研究所・プロテオミクス
バイオインフォマティクス・プロジェクト
リーダー
研究者番号：30284061
弘田 量二 (HIROTA RYOJI)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：20448385
栄徳 勝光 (EITOKU MASAMITSU)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：50552733